

Best Available Copy

BACTERIUM DETECTOR

Patent number: JP11178567
Publication date: 1999-07-06
Inventor: YAJIMA HIDEAKI; SHIMOJIMA MASAHIRO;
SAKAMOTO ICHIRO
Applicant: BML KK
Classification:
- **international:** C12M1/34; C12Q1/04; C12Q1/04; C12R1/19
- **europaen:**
Application number: JP19970365588 19971222
Priority number(s): JP19970365588 19971222

Report a data error here

Abstract of JP11178567

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a bacterium detector capable of accurately and easily assaying bacteria existing in foods or the like through equipping e.g. a means which puts a reaction product by an enzyme, of an emission substrate sensitive to the enzyme released by a specific kind of bacteria to light emission. **SOLUTION:** This bacterium detector has a culture means for culturing bacteria existing in a sample such as food (e.g. as incubator for keeping such a sample at a specified temperature), and a means which puts a reaction product by an enzyme, of a light emission substrate (e.g. 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside) sensitive to the enzyme released by a specific kind of bacteria (e.g. Escherichia coli, Staphylococcus aureus) among bacteria cultured with the above culture means to light emission; wherein it is preferable that the light-emitting means is an ultraviolet light-emitting means which emits ultraviolet rays of specific wavelength and is capable of putting a reaction product by an enzyme, of a light emission substrate sensitive to the enzyme released by a specific kind of bacteria to light emission.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

28

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-178567

(43) 公開日 平成11年(1999) 7月6日

(51) Int.Cl.⁶ 識別記号
 C 1 2 M 1/34
 C 1 2 Q 1/04
 // (C 1 2 Q 1/04
 C 1 2 R 1:19)

F I
 C 1 2 M 1/34 B
 C 1 2 Q 1/04

審査請求 未請求 請求項の数 6 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平9-365588

(22) 出願日 平成9年(1997)12月22日

(71) 出願人 591083336

株式会社ビー・エム・エル
 東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号

(72) 発明者 矢島 秀章

埼玉県川越市市場1361番地1 株式会社ビー・エム・エル総合研究所内

(72) 発明者 霜島 正浩

埼玉県川越市市場1361番地1 株式会社ビー・エム・エル総合研究所内

(72) 発明者 坂本 市郎

埼玉県川越市市場1361番地1 株式会社ビー・エム・エル総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 志村 光春

(54) 【発明の名称】 細菌検出装置

(57) 【要約】

【課題】食品等の試料中に存在する特定菌を正確かつ簡便に測定し得る細菌検出手段を提供すること。

【解決手段】試料を特定温度に保つための保温手段に代表される、試料中に存在する細菌を培養するための培養手段、及びこの培養手段により培養された細菌のうち、特定の細菌が放出する酵素に感受性を有する発光基質の、この酵素による反応物を発光させるための、紫外線発生手段発光手段に代表される、発光手段を備えた細菌検出装置を提供することにより、上記課題が解決され得ることを見出した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】試料中に存在する細菌を培養するための培養手段、及びこの培養手段により培養された細菌のうち、特定の細菌が放出する酵素に感受性を有する発光基質の、この酵素による反応物を発光させるための発光手段を備えた細菌検出装置。

【請求項2】培養手段が、試料を特定温度に保つための保温手段である請求項1記載の細菌検出装置。

【請求項3】発光手段が、特定の細菌が放出する酵素に感受性を有する発光基質の、この酵素による反応物を発光させ得る、特定波長の紫外線を放出し得る紫外線発生手段である請求項1又は請求項2記載の細菌検出装置。

【請求項4】試料を、特定の細菌が放出する酵素により反応する発光基質を含む培地に混入し、この試料が混入した培地を培養手段を用いてインキュベートし、かかるインキュベート後の培地に発光手段を施すことにより発生する発光により、前記特定の細菌を検出するための請求項1乃至請求項3のいずれかの請求項記載の細菌検出装置の使用。

【請求項5】特定の細菌が大腸菌であり、かつ発光基質が4-メチルウンベリフェリル- β -D-グルコシドである、請求項4記載の細菌検出装置の使用。

【請求項6】特定の細菌が黄色ブドウ球菌であり、かつ発光基質が4-メチルウンベリフェリルリン酸である、請求項4記載の細菌検出装置の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、細菌検出装置に関する技術分野の発明である。より詳細には、食品等の試料中に存在する特定菌を正確かつ簡便に測定し得る細菌検出装置、及びかかる細菌検出装置の使用に関する発明である。

【0002】

【従来の技術】近年の衛生教育の普及により、わが国は世界の中でも有数のクリーンな国であるという実感があり、一時はコレラや赤痢もすっかりと影をひそめていた感がある。しかしながら、最近は海外との交流も盛んになり、これらの細菌による食中毒もかなり頻繁に発生しつつある。これにわが国のグルメブームが拍車をかけ、輸入生鮮食料品の増加とも絡んで食中毒の患者数はいまだかなりの数にのぼっている。ところで、特に現在問題になっている病原性大腸菌による中毒も含めて、食中毒の9割以上は細菌感染によるものであるから、食中毒の発生を防ぐためには、予め調理環境等を清潔にして細菌が繁殖するのを食い止めることが必要であることは勿論である。

【0003】それにもかかわらず、食中毒菌が発生した場合には、食品が人の口に入る前に、その食中毒菌の存在を特定して、食中毒菌に汚染されていると考えられる食品を処分して、食中毒の発生を未然に防ぐことが肝要

である。さらに、一旦食中毒が発生した後においては、可能な限り早期にその発生源を特定して、さらなる食中毒菌による汚染を抑止する必要がある。そのため、正確かつ簡便な食中毒菌の検出手段を確立するための様々な試みがなされている。例えば、特定種類の細菌は、その生育に伴って特有の酵素を放出するという性質を利用して、この特有の酵素の作用により発光性物質に変換される「発光基質」と試料とを接触させることによって、その試料中の特定種類の細菌を検出し得ること等が報告されている。

【0004】

【発明が解決すべき課題】しかしながら、このような検出原理は提供されているものの、この検出原理を十分に活用して、正確かつ簡便に特定の細菌を検出し得る検出装置は、未だに提供されていない。

【0005】本発明は、このような特定の細菌を、正確かつ簡便に検出し得る細菌検出装置を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、この課題の解決に向けて鋭意検討を重ねた。その結果、試料中の特定の細菌を増殖させ得る培養手段と、この培養手段により増殖した特定の細菌を検出するための検出手段を併せ持つ、上記の「発光基質」を用いる細菌の検出原理を活用する細菌検出装置を提供することにより、この課題を解決し得ることを見出して本発明を完成した。すなわち、本発明者は、本願において以下の発明を提供する。

【0007】請求項1において、試料中に存在する細菌を培養するための培養手段、及びこの培養手段により培養された細菌のうち、特定の細菌が放出する酵素に感受性を有する発光基質の、この酵素による反応物を発光させるための発光手段を備えた細菌検出装置を提供する。

【0008】請求項2において、培養手段が、試料を特定温度に保つための保温手段である前記請求項1記載の細菌検出装置を提供する。

【0009】請求項3において、発光手段が、特定の細菌が放出する酵素に感受性を有する発光基質の、この酵素による反応物を発光させ得る、特定波長の紫外線を放出し得る紫外線発生手段である、前記請求項1又は請求項2記載の細菌検出装置を提供する。

【0010】請求項4において、試料を、特定の細菌が放出する酵素により反応する発光基質を含む培地に混入し、この試料が混入した培地を培養手段を用いてインキュベートし、かかるインキュベート後の培地に発光手段を施すことにより発生する発光により、前記の特定の細菌を検出するための、前記請求項1乃至請求項3のいずれかの請求項記載の細菌検出装置の使用を提供する。

【0011】請求項5において、特定の細菌が大腸菌であり、かつ発光基質が4-メチルウンベリフェリル- β -D-グルコシドである、前記請求項4記載の細菌検出

装置の使用を提供する。

【0012】請求項6において、特定の細菌が黄色ブドウ球菌であり、かつ発光基質が4-メチルウンベリフェリルリン酸である、前記請求項4記載の細菌検出装置の使用を提供する。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。本発明に係わる細菌検出装置（以下、本発明細菌検出装置という）は、特定の細菌が放出する酵素により反応する発光基質を含む培地（以下、発光基質含有培地ともいう）での、その特定の細菌の検出を極めて効率的行うことを主な目的とする細菌検出装置である。

【0014】すなわち、本発明細菌検出装置は、試料（例えば、食品、生ゴミ、排泄物等）と接触させた発光基質含有培地を、この検出装置内の「培養手段」で培養し、かかる培養後に、そのまま発光基質含有培地を同検出装置内の「発光手段」で、特定の細菌がこの培地中に存在する場合にのみ発光させて、この発光により特定の細菌をワンタッチで検出し得る細菌検出装置であり、本発明細菌検出装置は、細菌の培養と検出とを同一の装置内で場所を固定して行うことができるという点に特色を有する。

【0015】本発明細菌検出装置における「培養手段」は、発光基質含有培地中の特定の細菌を培養することができる限り特に限定されるものではない。具体的には、例えば、試料を特定温度に保つための保温手段、さらに具体的にはサーモスタット付きの電熱ヒーター等で一定温度に保ち得る機能等を例示することができる。

【0016】この機能において、発光基質含有培地を一定温度に調節する媒体は特に限定されず、例えば空気であっても水であってもよい。すなわち、本発明細菌検出装置の「培養手段」においては、上記の電熱ヒーターで空気を直接温めることにより、試料と接触させた発光基質含有培地をインキュベートすることも可能であり、さらに湯煎によってインキュベートすることも可能である。

【0017】インキュベート温度は、検出する対象となる特定の細菌に応じて適宜選択することができるが、可能な限りその特定の細菌の至適生育温度（概ね20℃～45℃の範囲に分布する）でインキュベートすることが、その特定細菌の検出を効率化するという観点において好ましい。

【0018】例えば、特定の細菌が、大腸菌（病原性大腸菌を含む）、黄色ブドウ球菌及び腸炎ビブリオ菌の場合には、35℃付近でインキュベートすることが好ましい。また、インキュベート時間も、本発明細菌検出装置で、特定の細菌を十分に検出することが可能な時間であれば許容され、特定の細菌の種類（増殖速度等）、培養温度、発光基質の感度等に応じて、適宜選択することが

できる。

【0019】本発明細菌検出装置における「発光手段」は、上記「培養手段」でインキュベートした発光基質含有培地を、その中に特定の細菌が存在する場合に発光させ得る手段である限り、特に限定されない。具体的には、例えば特定の細菌が放出する酵素に感受性を有する発光基質の、この酵素による反応物（以下、酵素反応物ともいう）を発光させ得る、特定波長の紫外線を放出し得る紫外線発生手段を挙げることができる。より具体的には、水銀灯等を例示することができる。

【0020】この「発光手段」は、酵素反応物を励起させ、この酵素反応物に対して特定の発光を促する。そして、酵素反応物におけるこの発光の有無を特定することにより、所望する特定の細菌の検出を行うことができる。

【0021】なお、特定の細菌が放出する酵素に感受性を有する発光基質としては、例えば4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルコシドを挙げることができる。この発光基質は、大腸菌が特異的に菌体外に分泌するβ-グルコシダーゼに対して感受性を有し、この酵素の作用により、β-D-グルコシドと4-メチルウンベリフェロンとに分解される。この酵素反応物である4-メチルウンベリフェロンに362nm～366nmの紫外線を照射すると、460nmの蛍光を発する。よって、この蛍光の有無を特定することにより、大腸菌を検出することが可能である。

【0022】また、4-メチルウンベリフェリルリン酸は、黄色ブドウ球菌が特異的に菌体外に分泌するフォスファターゼに対して感受性を有し、この酵素の作用により、リン酸と4-メチルウンベリフェロンとに分解される。この4-メチルウンベリフェロンにより、上記大腸菌と同様の原理で、黄色ブドウ球菌を検出することができる。

【0023】上記の発光基質含有培地は、検出すべき細菌の種類に応じて適宜選択することが可能であり、例えばインキュベーションを静置して行うことが可能である場合には、固形培地や半固形培地、特に半固形培地が好ましく、インキュベーションを振盪して行う必要がある場合には、液体培地を選択することが好ましい。また、この培地中には、検出すべき細菌の栄養源を適宜選択して含有させることができる。

【0024】このようにして、本発明細菌検出装置においては、特定の細菌の培養を「培養手段」により行い、培養を行ったそのままの位置で「発光手段」を用いて、発光基質の酵素反応物を発光させて、この特定の細菌の検出を行うことができる。

【0025】なお、本発明細菌検出装置には、この酵素反応物の発光を特定するための機能を設けることができる。この機能は、例えば発光を目視で特定する場合には、発光を、目視で直接本発明細菌検出装置の外部から

特定し得る「のぞき窓」を設置することによって付与することができる。また、発光を電氣的に検出し得る「発光センサー」等を設置することによっても付与することができる。

【0026】なお、本発明は、上述した本発明細菌検出装置の使用態様に基づいて、上記請求項4の「試料を、特定の細菌が放出する酵素により反応する発光基質を含む培地に混入し、この試料が混入した培地を培養手段を用いてインキュベートし、かかるインキュベート後の培地に発光手段を施すことにより発生する発光により、前記特定の細菌を検出するための本発明細菌検出装置の使用」をも提供する。

【0027】

【実施例】以下、本発明の実施例を図面を用いて説明するが、この実施例により、本発明の技術的範囲が限定されるものではない。第1図は、本発明細菌検出装置10の一実施態様の分解斜視図；第2図は、その全体像を表す斜視図；第3図は、II-II'における横断面図である。

【0028】これらの図において、上部構造11と下部構造13は、上部構造11における蓋部111と下部構造13における嵌合凸部151を介して嵌合可能な構造になっている。上部構造11において、蓋部111の下部に、その横断面が凹形状の板状体112が、ネジ(113等)を介して懸垂固定されている。ヒーター114が、懸垂された板状体112の底面112Aに取り付けられている。また、紫外線を照射可能な「発光手段」としての水銀灯115が、板状体112の両側面112BB'に取り付けられたソケット116、116'を介して、底面112Aに対して平行に架設されている。なお、図中117は水銀灯115のグローランプであり、118は水銀灯115の安定器であり、119は水銀灯115のスイッチである。ヒーター114及び水銀灯115は、外部からの電源によりオン・オフされるが、121はこの外部電源のスイッチであり、122はヒューズホルダーである。

【0029】蓋部111には、試料管の横振れ防止用板125〔試料管挿入口123が複数設けられており、この試料管挿入口123に対応する位置に試料管141が貫通することが可能な試料管貫通口(図示せず)が設けられている〕が、水銀灯115と蓋部111との間に、板状体112の両側面112BB'間にネジ(124等)を介して、水銀灯115と平行になるように架設されている。

【0030】また、反射板126の両端が、この反射板126が水銀灯115に対して観察用窓131側と反対側の面に位置し、かつその反射面が観察用窓131に向かうように、ソケット116及び116'の外周部に接着されている。特定の細菌の検出に際しては、透明性を有する素材の試料管141を、試料管挿入口123から

挿入して、上記横振れ防止用板125の試料管貫通口を貫通させて、試料管の底部がヒーター114の近傍に位置するように固定する。

【0031】試料管141は、その底部には発光基質含有培地142が封入されており、試料は、封入栓143に懸垂されている綿棒144で掻き取られて、この発光基質含有培地142中に混入している。上記試料管141のセットアップ後、スイッチ121をオンにすることによって、ヒーター114がオンの状態になり、本発明細菌検出装置内の空間101が温められることによって、発光基質含有培地142も温められる。本発明細菌検出装置には、サーモスタットが備わっており(図示せず)、このサーモスタットの働きにより、空間101の温度は、検出する細菌の生育に適した温度に調節され保たれる。このように、本発明細菌検出装置10において、試料をインキュベートすることができる。

【0032】なお、この細菌検出装置に、試料管141を振盪培養に処することを目的とした、蓋部111乃至横振れ防止用板125の振盪機能を付与することも可能である。上記インキュベート終了後、スイッチ119をオンにすることにより、水銀灯115を発光させて紫外線を試料管141に照射する。水銀灯115の近傍に設けられている反射板127によって、水銀灯115から試料管141とは異なる方向に向けて発せられた紫外線が試料管141に向けて反射され、効率的に試料管141に紫外線を照射することができる。

【0033】発光基質含有培地中の発光基質は、検出する特定の細菌が菌体外に放出する酵素に対して感受性を有しており、その細菌が試料内に存在する場合には、上記のインキュベーションに際して、発光基質が細菌が放出する酵素による分解を受け、紫外線の照射により発光する酵素処理物が培地中に生成することになる。

【0034】よって、試料内に特定の細菌が存在する場合には、水銀灯115から照射される紫外線により、発光基質含有培地に特有の発光が認められ、この発光を観察用窓131(好ましくはガラス等で仕切られている)を介して特定することにより、目的とする細菌を検出することができる。上述したように、この発光の特定は目視のみならず、センサー等で電氣的な信号として行うこともできる。

【0035】このように、本発明細菌検出装置10においては、細菌の培養と検出を連続的に行うことが可能であり、食品等の試料中に存在する特定菌を正確かつ簡便に測定し得る。なお、本発明細菌検出装置10で検出後の試料は、例えば試料管141内に殺菌液等を混入させることにより、簡単に後処理することが可能である。

【0036】

【発明の効果】本発明により、食品等の試料中に存在する特定菌を正確かつ簡便に測定し得る細菌検出装置、及びかかる細菌検出装置の使用が提供される。

【図面の簡単な説明】

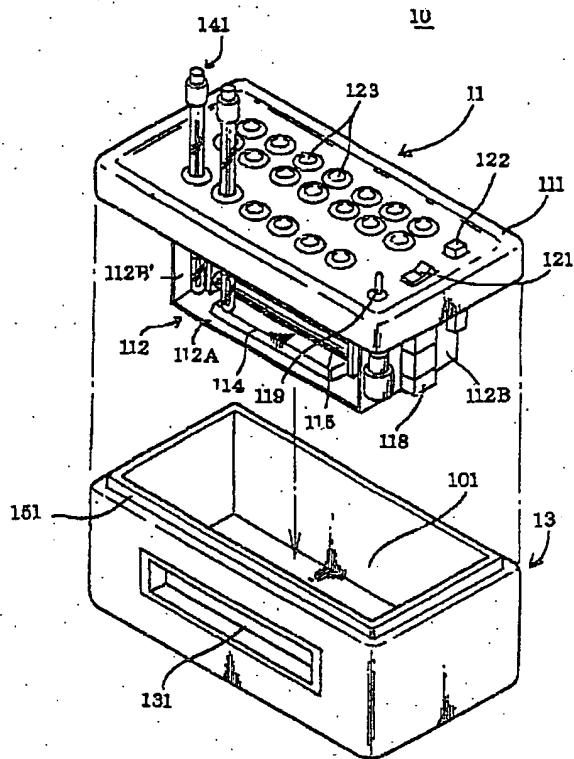
【図1】本発明細菌検出装置の一実施態様の分解斜視図である。

【図2】本発明細菌検出装置の全体像を表す斜視図である。

【図3】II-II'における横断面図である。

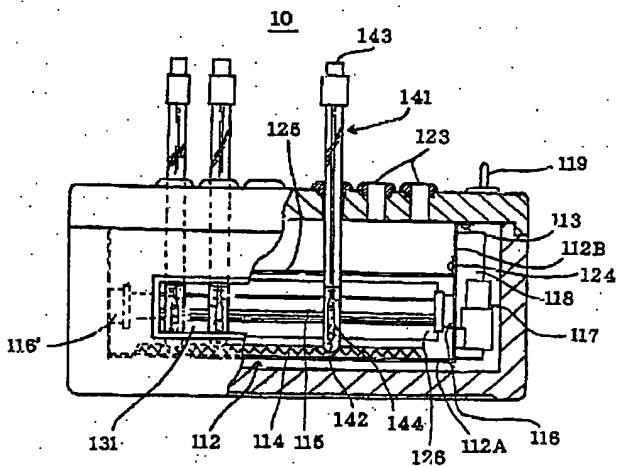
【図1】

第 1 図



【図3】

第 3 図



【図2】

第 2 図

